

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3318602号

(P 3 3 1 8 6 0 2)

(45) 発行日 平成14年 8月26日 (2002.8.26)

(24) 登録日 平成14年 6月21日 (2002.6.21)

(51) Int.Cl. ⁷

識別記号

F I

C07K 14/50

C07K 14/50

A61K 38/00

A61P 9/10

A61P 9/10

17/02

17/02

17/14

17/14

25/16

請求項の数14 (全25頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9 - 307721

(22) 出願日

平成 9年11月10日 (1997.11.10)

(65) 公開番号

特開平11 - 137255

(43) 公開日

平成11年 5月25日 (1999.5.25)

審査請求日

平成 9年11月10日 (1997.11.10)

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 1 2

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 0 8

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 1 1

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 1 5

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 1 3

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 1 4

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 0 7

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 0 9

微生物の受託番号

F E R M P - 1 6 4 1 0

(73) 特許権者

301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

(72) 発明者

今村 亨

茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技

術院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者

浅田 眞弘

茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技

術院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者

岡 修一

茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技

術院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者

鈴木 理

茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技

術院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者

米田 敦子

茨城県つくば市稲荷前24 - 18 - B201

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを含有する医薬組成物

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質であって、糖鎖が、(1)硫酸化多糖、(2)グリコサミノグリカン、(3)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わされた N - 型糖鎖、(4)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わされた O - 型糖鎖および(5)それらの組合せからなる群より選択される、前記のヘパリン結合性タンパク質。

【請求項 2】 糖鎖がヘパラン硫酸である、請求項 1 に記載のヘパリン結合性タンパク質。 10

【請求項 3】 ヘパリン結合性タンパク質が F G F ファミリーに属する因子またはその近縁の因子である、請求項 1 または 2 に記載のヘパリン結合性タンパク質。

【請求項 4】 糖鎖の付加を受けることができるペプチ

2

ドを介して糖鎖が共有結合している、請求項 1 に記載のヘパリン結合性タンパク質。

【請求項 5】 糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質が、以下の (a) または (b) のいずれかのタンパク質である、請求項 4 に記載のヘパリン結合性タンパク質。

(a) 配列番号 1、3、5、17、19、21、23、25、27 または 29 のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 1、3、5、17、19、21、23、25、27 または 29 のいずれかのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、F G F 活性を有し、かつ糖鎖の付加を受けることができるタンパク質。

【請求項 6】 ヘパリン結合性タンパク質の 2 次構造に

においてターンを形成している部位又は末端近傍に糖鎖が結合しているか、あるいは、糖鎖付加によって3次元構造が大きく変化しない部位に糖鎖が結合している、請求項1に記載のヘパリン結合性タンパク質。

【請求項7】 (1)硫酸化多糖、(2)グリコサミノグリカン、(3)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わされたN-型糖鎖、(4)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わされたO-型糖鎖および(5)それらの組合せからなる群より選択される糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、以下の工程：

(a) 糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質をコードするcDNAとを連結する工程、

(b) 当該連結cDNAを発現ベクターに組み込む工程、

(c) 当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入する工程、および

(d) 当該宿主細胞において、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖が共有結合しているヘパリン結合性タンパク質を発現させる工程を含む、前記の方法。

【請求項8】 糖鎖が硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンであり、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがプロテオグリカンコアタンパク質またはその一部分である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 糖鎖がヘパラン硫酸である、請求項7に記載の方法。

【請求項10】 ヘパリン結合性タンパク質がFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子である、請求項7～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 (1)硫酸化多糖、(2)グリコサミノグリカン、(3)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わされたN-型糖鎖、(4)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わされたO-型糖鎖および(5)それらの組合せからなる群より選択される糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、糖鎖を化学的結合法によりヘパリン結合性タンパク質に結合させる工程を含む、前記の方法。

【請求項12】 糖鎖がヘパラン硫酸である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 ヘパリン結合性タンパク質がFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子である、請求項11に記載の方法。

【請求項14】 請求項1～6のいずれかに記載のヘパリン結合性タンパク質を有効成分として含有する、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糖鎖を共有結合さ

せることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを含有する医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、ヘパリン結合性タンパク質、なかでも繊維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor、以下、「FGF」と記す。)ファミリーに分類されるタンパク質及びその類似体(fibroblast growth factor homologous factors)は、硫酸化多糖であるヘパリンとヘパラン硫酸に非共有的な結合様式で強く結合することが知られていた。そして繊維芽細胞増殖因子などのヘパリン結合性タンパク質をヘパリンなど硫酸化多糖との混合物とした場合、ヘパリン結合性タンパク質の生物活性や物性が変化し、その機能が変化し、高機能化する場合があることが知られていた。しかしながら、硫酸化多糖を混合しても、期待できる高機能化は限定的なものであった。また、これらを医薬組成物として用いる場合には、遊離状態の硫酸化多糖による好ましくない生理活性が問題となっていた。ヘパリン結合性タンパク質の高機能化を意図してヘパリン結合性タンパク質と硫酸化多糖を共有結合によって一体化したタンパク質はこれまで存在しなかった。

【0003】また、従来、ヘパリン結合性タンパク質、なかでもFGFファミリーに分類されるタンパク質及びその類似体の機能に対し、アスパラギン結合型糖鎖(以下、「N-型糖鎖」という。)またはセリン・スレオニン結合型糖鎖(以下、「O-型糖鎖」という。)の人工的な共有結合的一体化によってヘパリン結合性タンパク質の機能が高機能化出来ることは一切知られていなかった。さらにN-型糖鎖またはO-型糖鎖が与える一般的な影響については知られていなかった。例外として、FGF-6について、本来それが有するN-型糖鎖の役割が生体外翻訳の系で示唆されたが、直接証明されてはいなかった。これまでに、ヘパリン結合性タンパク質の高機能化を意図してヘパリン結合性タンパク質とN-型糖鎖またはO-型糖鎖を共有結合によって一体化した例は存在しなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、ヘパリン結合性タンパク質の機能改質をめざし、糖鎖を共有結合させたヘパリン結合性タンパク質とその製造方法を確立し、これを含む医薬組成物を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、(1)硫酸化多糖、(2)グリコサミノグリカン、(3)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わされたN-型糖鎖、(4)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わされたO-型糖鎖および(5)それらの組合せからなる群より選択される糖鎖の各々が、動物生体中では糖タンパク質の糖鎖として合成されることに着目し、これらの糖鎖のいず

れかの付加を受けることができるペプチドをコードする cDNA とヘパリン結合性タンパク質の cDNA を連結し、この連結 cDNA の遺伝子産物を動物細胞に生産させることにより、共有結合によって結合している上記糖鎖を分子内に有するヘパリン結合性タンパク質を製造できることを見出し、さらに、これらの糖鎖が付加したヘパリン結合性タンパク質の機能が向上していることを確認した。本発明はこのような知見に基づいて完成されたものである。

【 0 0 0 6 】すなわち、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質を提供する。糖鎖は、(1)硫酸化多糖、(2)グリコサミノグリカン、(3)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられた N - 型糖鎖、(4)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられた O - 型糖鎖および(5)それらの組合せからなる群より選択される。ヘパリン結合性タンパク質は F G F ファミリーに属する因子またはその近縁の因子であってもよい。ヘパリン結合性タンパク質は、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖を共有結合していてもよい。例えば、糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質は、以下の (a) または (b) のいずれかのタンパク質であってもよい。

【 0 0 0 7 】 (a) 配列番号 1、3、5、17、19、21、23、25、27 または 29 のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 1、3、5、17、19、21、23、25、27 または 29 のいずれかのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、F G F 活性を有し、かつ糖鎖の付加を受けることができるタンパク質。

【 0 0 0 8 】本発明のヘパリン結合性タンパク質においては、ヘパリン結合性タンパク質の 2 次構造においてターンを形成している部位又は末端近傍に糖鎖が結合しているか、あるいは、糖鎖付加によって 3 次元構造が大きく変化しない部位に糖鎖が結合しているとよい。

【 0 0 0 9 】また、本発明は、(1)硫酸化多糖、(2)グリコサミノグリカン、(3)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられた N - 型糖鎖、(4)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられた O - 型糖鎖および(5)それらの組合せからなる群より選択される糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、以下の工程：

(a) 糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードする cDNA とヘパリン結合性タンパク質をコードする cDNA とを連結する工程、

(b) 当該連結 cDNA を発現ベクターに組み込む工程、

(c) 当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入する工程、および

(d) 当該宿主細胞において、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖が共有結合しているヘパ

リン結合性タンパク質を発現させる工程を含むことを特徴とする前記の方法を提供する。糖鎖が硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンである場合には、糖鎖の付加を受けることができるペプチドはプロテオグリカンコアタンパク質またはその一部分であるとよい。また、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、糖鎖を化学的結合法によりヘパリン結合性タンパク質に結合させる工程を含む前記の方法を提供する。糖鎖は、(1)硫酸化多糖、(2)グリコサミノグリカン、(3)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられた N - 型糖鎖、(4)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられた O - 型糖鎖および(5)それらの組合せからなる群より選択され、ヘパリン結合性タンパク質は F G F ファミリーに属する因子またはその近縁の因子であってもよい。さらに、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化された前記のヘパリン結合性タンパク質を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】本発明において、糖鎖を共有結合させるべきヘパリン結合性タンパク質は、ヘパリン結合性を有するタンパク質であり、具体例としては、FGF ファミリーに属する因子または近縁の因子、またはヘパリン結合性を有するが前者と構造的な類似性はない他のタンパク質を挙げることができる。ここで述べる他のタンパク質としては、具体的には、ヘパリン結合性上皮細胞増殖因子様因子 (HB-EGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF) などが挙げられるが、これに限定されるものではない。FGF ファミリーに属する因子または近縁の因子の具体例としては、FGF-1~10 や、FHF (fibroblast growth factor homologous factor)-1 ~ 4 などが知られている。ヘパリン結合性タンパク質は、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖を共有結合していてもよい。例えば、糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質は、以下の (a) または (b) のいずれかのタンパク質であってもよい。

【 0 0 1 1 】 (a) 配列番号 1、3、5、17、19、21、23、25、27 または 29 のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 1、3、5、17、19、21、23、25、27 または 29 のいずれかのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、F G F 活性を有し、かつ糖鎖の付加を受けることができるタンパク質。

【 0 0 1 2 】配列番号 1、3、5、17、19、21、23、25、27 および 29 のアミノ酸配列を有するタンパク質は、例えば、配列番号 2、4、6、18、20、22、24、26、28 および 30 の DNA 配列によりそれぞれコードされる。これらのタンパク質は、FG

Fファミリーに属する因子のペプチド配列の他、糖鎖の付加を受けることができるペプチド配列とシグナルペプチドの配列を含んでいる。本明細書でいうヘパリン結合性タンパク質は、配列表に記載されたcDNAが一次的に規定するタンパク質に加えて、細胞から分泌される際にそのアミノ末端に存するシグナルペプチドと呼ばれる分泌の為のペプチド配列が切断された形のタンパク質を含む。本発明の医薬組成物の有効成分として含有させるヘパリン結合性タンパク質は、初めからシグナルペプチドを欠損する形で製造してもその有用性には変化がない。

【0013】ヘパリン結合性タンパク質に共有結合させる(1)硫酸化多糖、(2)グリコサミノグリカン、(3)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられたN-型糖鎖、(4)硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられたO-型糖鎖および(5)それらの組合せからなる群より選択される糖鎖は、共有結合させることによりヘパリン結合性タンパク質が高機能化されるものであり、ヘパリン硫酸やコンドロイチン硫酸などの硫酸化多糖およびグリコサミノグリカンを例示することができる。本明細書において、「高機能化」とは、対象のタンパク質の活性が、糖鎖を共有結合させていないタンパク質に比べて上がることを意味し、糖鎖をタンパク質に共有結合させることにより、熱、酸またはアルカリ等による処理後の残存活性が、糖鎖を共有結合させていないタンパク質の場合よりも高くなる。本明細書でいう硫酸化多糖とは、タンパク質の一次構造に存するセリン残基に結合したキシロースを起点として伸長する、もしくは後述のN-型糖鎖やO-型糖鎖の非還元末端側に伸長する、あるいは遊離状態で存在する多様な糖鎖構造を総称するものであり、その多くはアミノ糖とウロン酸(またはガラクトース)の二糖単位の繰り返し構造をもち、いくつかの水酸基あるいはアミノ基が硫酸基で置換されているものをいう。また、グリコサミノグリカンとは、同様の構造を有するものであるが、硫酸基での置換がないものも含む。本明細書では、これらを総称して、硫酸化多糖等と記す。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」(永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック)などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図1に示す。本明細書でいうN-型糖鎖とは、タンパク質の一次構造に存するアスパラギン残基に結合したN-アセチルガラクトサミンを起点として伸長する多様な糖鎖構造を総称するものであるが、硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられるものでなければならない。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」(永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック)などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図2に示す。本明細書でいうO-型糖鎖とは、タンパク質の一次構造に存するセリン残基またはスレオニン残基に結合したN-アセチルガラクトサミンを起点として伸長する多様な糖鎖構造を総称

するものであるが、硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンと組み合わせられるものでなければならない。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」(永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック)などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図3に示す。これらの硫酸化多糖等は、その機能を発揮する限りにおいて、その糖鎖配列の一部に、付加、欠失、置換または修飾があってもよい。

【0014】糖鎖をヘパリン結合性タンパク質に結合させるにあたっては、糖鎖のみを直接ヘパリン結合性タンパク質に共有結合させてもよいし、糖鎖を共有結合している任意の長さのペプチド鎖をヘパリン結合性タンパク質に共有結合させてもよい。本発明の糖鎖が共有結合しているヘパリン結合性タンパク質(以下、「糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質」と記す。)を製造するには、まず、糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質をコードするcDNAとを連結し、これを適切な発現ベクターに組み込み、当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入して、糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。

【0015】各種ヘパリン結合性タンパク質のcDNAは、DDBJ(日本DNAデータバンク)など遺伝子バンクに登録された配列から適当なプライマーを設計し、当該動物の当該組織のmRNAよりRT-PCR(逆転写PCR)を行うことによって、取得できる。硫酸化多糖等付加型ヘパリン結合性タンパク質を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAを硫酸化多糖等の付加を受けることが知られているペプチドをコードするcDNAと連結し、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込み、当該ベクターを宿主細胞に導入して、硫酸化多糖等付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。硫酸化多糖等の付加を受けることが知られているペプチドとしては、各種プロテオグリカン(例えば、シンデカン、グリピカン、パールカンなど)のコアタンパク質またはその一部分が挙げられる。プロテオグリカンのコアタンパク質の一部としては、プロテオグリカンの糖鎖付加部位と考えられるSer-Glyの繰り返し配列を含むペプチドが挙げられる。

【0016】N-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAをN-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドをコードするcDNAとライゲートし、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込む。さらに当該ベクターを宿主細胞に導入し、N-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。N-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドの例として、Asn-X-Thr、Asn-X-Ser(配列中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である。)が挙げられる。

【0017】O-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質

を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAを0-型糖鎖の付加を受けることが既知であるペプチドをコードするcDNAとライゲートし、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込む。さらに当該ベクターを宿主細胞に導入し、0-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させる。0-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドの例として、Ala-Thr-Pro-Ala-Proが挙げられる。本発明で糖鎖を結合させる部位としては、ヘパリン結合性タンパク質の2次構造においてターンを形成している部位又は末端近傍や糖鎖付加によって3次元構造が大きく変化しない部位がよい。本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の製造方法の一例を以下に説明する。

【0018】まず、分泌シグナルおよび糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを合成し、あるいはPCR反応によって増幅し、これをヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドの5'端に組み込む。分泌シグナルおよび糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドとしては、例えば、典型的な分泌型糖タンパク質のアミノ末端を利用することができるが、具体的には、マウスFGF-6のN末端より40残基のアミノ酸などが挙げられる。ヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドは、ヘパリン結合性タンパク質をコードするDNAを適当なプラスミドに組み込むことにより調製することができる。このヘパリン結合性タンパク質をコードするDNAを組み込むプラスミドとしては、宿主内で複製保持されるものであれば、いずれも使用することができるが、例えば大腸菌由来のpBR322、pUC18、及びこれらを基に構築されたpET-3cなどを挙げることができる。

【0019】ヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドに上記のオリゴヌクレオチドを組み込む方法としては、例えばT.Maniatisら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 239 (1982)に記載の方法などが挙げられる。上記のようにして作製したプラスミドから、分泌シグナル、糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドおよびヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域(以下、「糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域」と記す。)を切り出し、これを発現に適したベクター中のプロモーターの下流に連結することにより、発現型ベクターを得ることができる。

【0020】上記の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域はその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端には翻訳終了コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有してもよい。さらに該コーディング領域にコードされているタンパク質を発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターで

あればいかなるものでもよい。形質転換する宿主が枯草菌である場合には、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合には、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーターが挙げられる。

【0021】このようにして構築された糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を有する組み換えDNAを組み込むプラスミドとしては、宿主細胞内で発現されるものであれば、いずれも使用することができるが、例えば大腸菌由来のpBR322、pUC18などを基に構築されたベクターなどを挙げるができる。プラスミドに組み込む方法としては、例えばT.Maniatisら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 239 (1982)に記載の方法などが挙げられる。上記の組み換えDNAを含むベクターを宿主細胞に導入することにより、該ベクターを保持する形質転換体を製造する。

【0022】宿主細胞としては、糖鎖付加経路を有するものであれば、いかなるものであってもよく、枯草菌(例えばBacillus subtilis DB105)、酵母(例えばPichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae)、動物細胞(例えばCOS cell, CHO cell, BHK cell, NIH3T3 cell, BALB/c3T3 cell, HUVE cell, LE11 cell)、昆虫細胞(例えば, Sf-9 cell, Tn cell)などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【0023】上記の形質転換は、それぞれの宿主について一般的に行われている方法で行う。また、一般的でなくとも適用可能な方法ならばよい。例としては、宿主が酵母であればリチウム法その他の方法により作成したコンピュタント細胞に組み換えDNAを含むベクターを温度ショック法あるいはエレクトロポレーション法により導入する。宿主が動物細胞であれば、増殖期等の細胞に組み換えDNAを含むベクターをリン酸カルシウム法、リポフェクション法あるいはエレクトロポレーション法により導入する。

【0024】このようにして得られた形質転換体を培地にて培養することにより、糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を産生させる。形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては、それぞれの宿主について一般的に用いられているものを用いる。または一般的でなくとも適用可能な培地ならばよい。例としては、宿主が酵母であればYPD培地などを用いる。宿主が動物細胞であれば、Dulbecco's MEMに動物血清を加えたものなどを用いる。培養は、それぞれの宿主について一般的に用いられている条件で行う。また一般的でなくとも適用可能な条件ならばよい。例としては、宿主が酵母であれば約25~37度、約12時間~2週間行い、必要により通気や攪拌を加えることができる。宿主が動物細胞であれ

ば約32～37 で、5% CO₂、100%湿度の条件で約24時間～2週間行い、必要により気相の条件を変えたり攪拌を加えることができる。

【0025】上記のような形質転換体の培養物から糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を得るには、培養液中に放出されたものを、遠心分離後の上澄み液から直接回収できる。また、培養菌体あるいは細胞から抽出する場合には、培養後、ホモジェナイザー、フレンチプレス、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解によって菌体あるいは細胞を破壊することにより菌体外に目的のタンパク質を溶出させ、可溶性の画分から該タンパク質を得ることができる。また目的のタンパク質が不溶性画分に含まれる場合は菌体あるいは細胞を破壊後、遠心分離により不溶性画分を回収し、塩酸グアニジンなどを含む緩衝液などによって可溶性にして回収する方法も用いる。このほか塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤を含む緩衝液によって直接菌体あるいは細胞を破壊し、菌体外に目的のタンパク質を溶出させる方法もある。

【0026】上記上澄み液から糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を精製するには、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析、溶媒沈殿、透析、限外濾過、ゲル濾過、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動などが使用される。さらに、多くのヘパリン結合性タンパク質については、ヘパリンセファロースを担体としたアフィニティークロマトグラフィー法が適用できる。

【0027】このようにして得られた標品は糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の活性が損なわれない限りにおいて透析、凍結乾燥を行い、乾燥粉末とすることもできる。さらに、担体として血清アルブミンなどを添加して保存することは、標品の容器への吸着を防ぐのに有効である。また、精製過程、あるいは保存過程での微量の還元剤の共存は、該標品の酸化を防ぐのに好適である。還元剤としては、-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、グルタチンなどが挙げられる。

【0028】本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、化学的な方法で糖鎖をヘパリン結合性タンパク質に結合させることにより、製造することもできる。その具体的な方法としては以下のa)、b)いずれか、あるいはこれらの組み合わせによる方法が考えられる。

a) 例えば、まず、これらの糖鎖を生物学的または化学的合成法またはこれの適宜組み合わせた方法により完成させる。その際、糖鎖末端に適当なタンパク質結合用の残基を導入しておくこともできる。例えば、完成された糖鎖の還元末端を還元および部分酸化することによりアルデヒド基を形成し、これをタンパク質中のアミノ基とアミノ結合させることにより、糖鎖とタンパク質の

結合が完成する。

【0029】b) 例えば、まず、単糖の還元末端、あるいは単糖に結合した適当なタンパク質結合用の残基を還元および部分酸化することによりアルデヒド基を形成し、これをタンパク質中のアミノ基とアミノ結合させることにより、単糖とタンパク質の結合が完成する。この単糖の水酸基などの官能基にさらなる単糖や糖鎖などを結合させることにより、糖鎖を完成させる。この結合には生物学的または化学的合成法またはこれの適宜組み合わせた方法などが考えられる。

【0030】ヘパリン結合性タンパク質に糖鎖を共有結合させることにより高機能化したタンパク質は医薬として利用可能である。例えば、本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、FGFの生理的機能を調節する作用を有する。FGFの生理的機能とは、具体的には、繊維芽細胞、血管内皮細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、グリア細胞の増殖を促進または抑制することという。従って、本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、細胞増殖や肝臓など組織再生の促進、創傷治癒や神経機能調節、および繊維芽細胞等の増殖調節に有効であり、各種疾病、具体的には、繊維芽細胞腫、血管腫、骨芽腫、神経細胞死、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経芽腫、健忘症、痴呆病、心筋梗塞の予防や治療に有用であり、発毛剤、育毛剤などとしても利用可能である。

【0031】上記のようにして得られた糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、医薬的に許容できる溶剤、賦形剤、担体、補助剤などを使用し、製剤製造の常法に従って液剤、ローション剤、エアゾール剤、注射剤、散剤、顆粒剤、錠剤、坐剤、腸溶剤およびカプセル剤などの医薬組成物としてもよい。医薬組成物中、有効成分である糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の含有量は、0.0000000001～1.0重量%程度とすればよい。

【0032】該医薬組成物は、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ等の哺乳動物に対して非経口的にまたは経口的に安全に投与することができる。本医薬組成物の投与量は、剤形、投与ルート、症状等により適宜変更しうるが、例えばヒトを含む哺乳動物に投与する場合、当該糖鎖付与型ヘパリン結合性タンパク質を、0.0001～100mgを患部に1日に数回適用することが例示される。

【0033】微生物の寄託
本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする遺伝子(配列番号2、4、18、20、22、24、26、28および30のDNA配列をそれぞれ有する)を組み込んだプラスミドを含む大腸菌 DH5 株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM P-16412、FERM P-16408、FERM P-16411、FERMP-16415、FERM P-16413、FERM P-16414、FERM P-16407、FERM P-16409 およびFERM P-16410にて、平成9年9月10日に寄託

されている。

【 0 0 3 4 】

【実施例】以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

〔実施例 1〕

【 0 0 3 5 】 1) S/FGF-1a-II プラスミドの構築

1. ヒトリユウドカン cDNA 断片の作成

phR7A8は、ヒトリユウドカンの cDNA (PCR産物) を pBluescript II (KS+) クローニングベクターの EcoR V 部位に挿入したプラスミドである。アセプション番号 D13 292 に示される mRNA 配列のうち、7 番目から 2610 番目までを含む (B.B.R.C. Vol. 190, No. 3, p.814-822, 1993 を参照のこと)。これを Pvu II で消化し、得られた 2,232塩基対の DNA断片を鋳型として PCR(Polymerase Chain Reaction:ポリメレース連鎖反応) を行った。プライマーとして # 109 (5'-TTG TCG ACC CAC CAT GGC CCC CGC CCG TCT-3') (配列番号 7) および、# 111 (5'-TTG ATA TCT AGA GGC ACC AAG GGA TG-3') (配列番号 8) を用いた。特異的に増幅された 276塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR V および Sal I で二重切断した。得られた、268 塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

【 0 0 3 6 】 2. FGF-1a/pBluescript II (KS+)

ヒト FGF-1 cDNA を鋳型とし、# 967 (5'-GCG TCG ACA GCG CTA ATT ACA AGAAGC CCA AAC TC-3') (配列番号 9) および # 630 (5'-CCG AAT TCG AAT TCT TTAATC AG A AGA GAC TGG-3') (配列番号 10) をプライマーとして PCR反応を行った。特異的に増幅された 434塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR I および Sal I で二重切断した。得られた、422 塩基対のバンドを分離抽出し、これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pBluescript II (KS+) クローニングベクター (2934 塩基対) に挿入して、FGF-1a/pBluescript II (KS+) を得た。FGF-1a/pBluescript II (KS+) を Aor51 H I および Sal I で順次消化し、得られた2626塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

【 0 0 3 7 】 3. S/FGF-1a-II キメラ遺伝子の作成

ヒトリユウドカンの PCR産物の EcoR V/Sal I 断片、及び FGF-1a/pBluescript II (KS+) の Aor51H I/Sal I 断片を DNA連結反応に供し、S/FGF-1a-II/pBluescript II (KS+) ベクターを得た。さらにこれを、EcoR I および Sal I で二重切断し、得られた、678 塩基対のバンドを分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo発現ベクター (5916塩基対) に挿入して、S/FGF-1a-II/pMEXneo を得た。この発現型ベクターは、配列番号 2 の塩基配列を含む。

【 0 0 3 8 】 2) S/FGF-1a-II の発現

得られた S/FGF-1a-II/pMEXneoをリポフェクション法に

よって CHO-K1 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞 K1 亜株) に遺伝子導入し、ジェネティシン存在下で培養することによって遺伝子導入細胞を選択した。得られた細胞を培養皿ほぼいっぱいになるまで増やし、培地を無血清培地に交換することによって物質生産量を増大させた。2 日毎に培地を交換し、得られた馴化培地は低速遠心分離した後、その上清を 4 で保存した。

【 0 0 3 9 】 3) N-FGF-6/1a-IV プラスミドの構築

1. マウス FGF-6 cDNA 断片の作成

10 マウス FGF-6 cDNA を鋳型とし、# 1048 (5'-GCG TCG ACC CAC CAT GTC CCG GGG AGC AGG ACG TGT TCA GGG CAC GCT GCA GGC TCT CGT CTT C-3') (配列番号 11) および # 968 (5'-GCG ATA TCC AGT AGC GTG CCG TTG GCG CG-3') (配列番号 12) をプライマーとして PCR反応を行った。特異的に増幅された 138塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR V および Sal I で二重切断した。得られた、130 塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

【 0 0 4 0 】 2. N-FGF-6/1a-IVキメラ遺伝子の作成

20 マウス FGF-6の PCR産物の EcoR V/Sal I 断片、及び FGF-1a/pBluescript II(KS+) の Aor51H I/Sal I 断片を DNA連結反応に供し、N-FGF-6/1a-IV/pBluescript II (KS+)ベクターを得た。さらにこれを、EcoR I および Sal I で二重切断し、得られた、540 塩基対のバンドを分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo発現ベクター (5916塩基対) に挿入して、N-FGF-6/1a-IV/pMEXneo を得た。この発現型ベクターは、配列番号 4 の塩基配列を含む。

【 0 0 4 1 】 4) N-FGF-6/1a-IV の発現

30 上述、S/FGF-6/1a-IIと同様に N-FGF-6/1a-IV/pMEXneo を CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、N-FGF-6/1a-IV を培養上清中に分泌させた。

【 0 0 4 2 】 5) O-FGF-6/1aプラスミドの構築

1. N-FGF-6/1a<NQ> キメラ遺伝子の作成

40 N-FGF-6/1a/pBluescript II (KS+) ベクターを鋳型とし、# 105 (5'-GCG TCGACC CAC CAT GTC-3') (配列番号 13) および # 124 (5'-GCG ATA TCC AGT ACGGTG CCT TGG GCG CG-3') (配列番号 14) をプライマーとして PCR反応を行った。特異的に増幅された 138塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR V および Sal I で二重切断した。得られた、130 塩基対のバンドを、FGF-1a/pBluescript II (KS+) の Aor51H I/Sal I断片と共に DNA連結反応に供し、N-FGF-6/1a<NQ>/pBluescript II (KS+) ベクターを得た。

【 0 0 4 3 】 2. O-FGF-6/1a キメラ遺伝子の作成

50 N-FGF-6/1a<NQ>/pBluescript II (KS+) を鋳型とし、# 098 (5'-GCT GGA GGAGGC TGC TAC TCC AGC TCC AAA CCA TTA CA-3') (配列番号 15) および、# 116(5'-GCC GC T CTA GAA CTA GTG GAT-3') (配列番号 16) をプライマーとして一次 PCR反応を行い、特異的に増幅された 2

10塩基対のバンドを精製し、この PCR産物と # 115 (5' -AAC AAA AGC TGG GTA CCG GG-3')をプライマーとして二次 PCR反応を行った。特異的に増幅された 631塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出、精製後、EcoR I および Sal I で二重切断した。得られた、558 塩基対のバンドを、分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo発現ベクター (5916 塩基対) に挿入して、0-FGF-6/1a/pMEXneoを得た。この発現型ベクターは、配列番号 6 の塩基配列を含む。

【 0 0 4 4 】 6) 0-FGF-6/1aの発現

上述のS/FGF-1a-II と同様に 0-FGF-6/1a/pMEXneo を CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、0-FGF-6/1aを培養上清中に分泌させた。

【 0 0 4 5 】 7) 大腸菌でのFGF-1aの発現

上述のとおり得られたヒトFGF-1a cDNA のEcoR I, Sal I 二重切断断片を、大腸菌用発現ベクターであるpET3c に組み込んだ。得られたベクターで大腸菌BL21(DE3)pLysSを形質転換した後、対数増殖期にある菌体をIPTG (イソプロピルチオ - ガラクトシド) で刺激することによって、導入遺伝子の発現を誘導した。この菌体を集め、超音波破碎することによってFGF-1aを遊離させ、遠心上清中にこれを回収した。

【 0 0 4 6 】 8) ペプチドN-グリコシダーゼ F処理によるN-型糖鎖の除去

後述のとおり (試験例 1 参照) ヘパリンセファロースビーズで濃縮したN-FGF-6/1a-II を電気泳動用緩衝液で煮沸、溶出した。その一部に、NP-40(終濃度1%)、トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、ペプチドN-グリコシダーゼ F(0.3 U) を加え、37 で一晩保温した後、100 で3分間加熱して酵素反応を止めた。これを後述のとおりSDS変性電気泳動によって解析した。

【 0 0 4 7 】 上記、実施例のうち、「1.ヒトリュウドカン c DNA 断片の作成」や「1.マウスFGF-6cDNA断片の作成」で述べたPCRプライマー (111, 968) を適当な配列に変更し、さらに酵素処理に用いるEcoR Vを平滑末端を生じる適当な制限酵素に変更することによって、様々なS/FGF-1a、N-FGF-6/1aを作成することができる。このようなcDNA配列の例を配列番号 8, 20, 22, 24, 26, 28 に示す。また、上記、実施例のうち、「2.0-FGF-6/1aキメラ遺伝子の作成」で述べたPCRに用いる鋳型をS/FGF-1a-II/pBluescript II(KS+) やN-FGF-6/1a-IV/pBluescript II(KS+) などを用いることによって、あるいはPCRプライマー (098, 116, 115) を適当な配列に変更することによって、あるいはその両方を組み合わせることによって、様々な0-FGF-6/1aを作成することができる。このようなcDNA配列の例を配列番号 30 に示す。

【 0 0 4 8 】 [試験例 1] SDS 変性電気泳動
各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地に加えたヘパリンセファロースビーズを洗浄後、直接、電気泳動

用緩衝液 (SDS, 2-メルカプトエタノール含有) と共に煮沸し、溶出された蛋白質を試料とした。12.5 %アクリルアミドゲルを用い、SDS、2-メルカプトエタノール存在下で電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に電気的に転写後、抗 FGF-1単クローナル抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG抗体を用いて染色し、化学発光法で検出した (図 4)。図中、左の矢は分子量既知の標準タンパク質の泳動位置とその分子量 (単位:ダルトン) を示す。図中、A)はS/FGF-1a-II のSDS変性電気泳動図を、B)は、大腸菌で生産したFGF-1a (レーンa)、N-FGF-6/1a-IV をペプチドN-グリコシダーゼ Fで処理することによりN-型糖鎖を除去したN-FGF-1a-IV (レーンb)、N-FGF-6/1a-IV (レーンc)および0-FGF-6/1a (レーンd)のSDS変性電気泳動図を示す。

10

【 0 0 4 9 】 [試験例 2] DNA 合成促進活性

HUVEC (ヒト臍帯由来血管内皮細胞) は 15 % 血清存在下でも FGF などの増殖因子が欠乏すると細胞周期が停止する。このような状態においた HUVECに S/FGF-1a-II, N-FGF-6/1a-IV, 0-FGF-6/1a あるいは大腸菌で生産させた FGF-1a を添加し、18時間後、放射標識されたチミジン (3H) を 6 時間取り込ませてこの間にDNA中に取り込まれた放射能によって新たに合成された DNA量とした。

20

【 0 0 5 0 】 1. S/FGF-1a-IIのヒト血管内皮細胞へのDNA合成促進効果 (ヘパリン非依存性)

S/FGF-1a-II 遺伝子導入細胞の無血清培地での馴化培地を PBSに対して透析後、ヘパリン共存下 (5 μg/ml)、あるいはヘパリン非共存下で、HUVEC の DNA合成促進活性を調べた。その結果、S/FGF-1a-II は、大腸菌で生産した FGF-1a とは異なり、ヘパリン非依存的に HUVECの DNA合成を促進した (図 5)。

30

【 0 0 5 1 】 2. N-FGF-6/1a-IVのヒト血管内皮細胞へのDNA合成促進効果

N-FGF-6/1a-IV 遺伝子導入細胞の無血清培地での馴化培地を PBSに対して透析後、ヘパリン共存下 (5 μg/ml)、あるいはヘパリン非共存下で、HUVEC の DNA合成促進活性を調べた (図 8)。その結果、N-FGF-6/1a-IV は、大腸菌で生産した FGF-1a と同様に HUVECの DNA合成を促進するものの、そのヘパリン依存性は弱く、ヘパリン非共存下では大腸菌由来FGF-1aよりも強いDNA合成促進活性を示した (図 8)。

40

【 0 0 5 2 】 [試験例 3] ヘパリン親和性アフィニティークロマトグラフィー

前述 2) で得られたS/FGF-1a-II について、ヘパリン親和性を調べた。S/FGF-1a-II の分泌細胞の馴化培地にヘパリンセファロースビーズを加え、4 で2時間以上撪拌した。低速遠心によって沈降するビーズを回収し、生理的リン酸緩衝液 (PBS: phosphate buffered saline, pH 7.4) で十分に洗浄後、2.5 M NaClを含む PBSによってヘパリン固定化ビーズに結合した蛋白質を溶出した。さらにこの溶出液に蒸留水を加え塩濃度を低下させ

50

た後、再び、ヘパリン親和性アフィニティービーズを充填した高速液体クロマトグラフィーに供し、NaClの濃度勾配によってS/FGF-1a-II を溶出した。大腸菌由来FGF-1aは約1.0 M NaCl付近に溶出されるのに対し、S/FGF-1a-II は約0.4 M NaClで溶出され、固定化ヘパリンへの親和性が低下しているものと考えられた(図9)。図9で見られる1.0 M NaCl付近の小さなピークについては、SDS変性電気泳動の結果、S/FGF-1a-II の分解産物と考えられる。

【 0 0 5 3 】〔試験例 4〕 FGF-1a 類似蛋白質の耐熱安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地を PBSに 対して十分に透析し、その一部を 56 または 70 に 保温した PBS中に 30 分間保持、あるいは、室温で12時 間保持した後、再び 4 の PBSに対して透析し、試料と した。S/FGF-1a-II の安定性は、各種処理の後、HUVEC のDNA 合成促進活性試験に供し、4 のPBS で12時間透 析した試料との比較によって、安定性の指標とした。室 温、12時間では、大腸菌由来 FGF-1a でもヘパリンによ ってその活性は保護されるが、S/FGF-1a-II はヘパリン

【 0 0 5 4 】〔試験例 5〕 FGF-1a 類似蛋白質の耐 酸、耐アルカリ安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地を PBSに 対して十分に透析し、その一部を pH 4.0 のクエン酸緩 衝液または pH 10.0の炭酸ナトリウム緩衝液中で12時間 透析し、再び 4 の PBSに対して透析した後、試料とし た。S/FGF-1a-II の安定性は、各種処理の後、HUVEC の DNA 合成促進活性試験に供し、4 のPBS で12時間透 析した試料との比較によって、安定性の指標とした。S/FG F-1a-II はヘパリンの存在の有無に関わらず pH 4.0 の

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
 1 5 10 15
 Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
 20 25 30
 Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val
 35 40 45
 Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
 50 55 60
 Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Pro Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr
 85 90 95
 Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val
 100 105 110
 Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser

酸処理によってもほとんど活性の低下がみられず、耐酸 安定性の向上が認められた(図6)。また、pH 10.0 の アルカリ処理によって、大腸菌由来 FGF-1a がほとんど 活性を消失するにも関わらず、S/FGF-1a-II は約50%の 活性を保持しており、耐アルカリ安定性についても向上 が認められた(図6)。

【 0 0 5 5 〕〔試験例 6〕 FGF-1a 類似蛋白質の抗蛋 白質分解酵素安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地をPBSに 対して十分に透析し、その一部に各種濃度のトリプシン 液 (0.0001~0.1%) を加え、37 で1時間保温した。こ れを前述のSDS変性電気泳動に供し、残存するバンドの 強度を処理前の試料と比較することで安定性の指標とし た。その結果、図7に示すとおり、S/FGF-1a-II は0.00 1%のトリプシン処理で88%、0.01%で35%の染色強度が残 存するのに対し、大腸菌由来FGF-1aは0.001%で58%、0.0 1%で6%にまでバンドの強度が減少しており、S/FGF-1a-I I は蛋白質分解酵素に対する抵抗性が增大しているもの と考えられた(図7)。

【 0 0 5 6 〕

【発明の効果】本発明の新規な糖鎖付加型ヘパリン結合 性タンパク質は、耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性、蛋白 質分解酵素抵抗性などの安定性に優れている。従って、 本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を医薬品 に利用することにより、生体内での安定性、特に、耐酸 性、耐アルカリ性といった安定性に優れ、経口投与への 適用が可能な医薬品を設計することができる。

【 0 0 5 7 〕

【配列表】

配列番号： 1
 配列の長さ： 2 2 1
 配列の型： アミノ酸
 トポロジー： 直鎖状
 配列の種類： ペプチド

10

20

30

19
115 120 125
Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln
130 135 140
Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro
145 150 155 160
Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn
165 170 175
Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu
180 185 190
Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln
195 200 205
Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
210 215 220

【 0 0 5 8 】 配列番号 : 2

配列の長さ : 6 6 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA t o mRNA

配列

ATGGCCCCCG CCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTG
TTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GAC
CTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAGTGGGG CCC
GGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
TCTGGCTCTG GAGATCTGGA TGACTTGGAA GAC
TCCATGA TCGGCCCTGA AGTTGTCCAT 240
CCCTTGGTGC CTCTAGATGC TAATTACAAG AAG
CCCAAAC TCCTCTACTG TAGCAACGGG 300
GGCCACTTCC TGAGGATCCT TCCGGATGGC ACA
GTGGATG GGACAAGGGA CAGGAGCGAC 360
CAGCACATTC AGCTGCAGCT CAGTGCGGAA AGC
GTGGGGG AGGTGTATAT AAAGAGTACC 420
GAGACTGGCC AGTACTTGGC CATGGACACC GAC
GGGCTTT TATACGGCTC ACAGACACCA 480
AATGAGGAAT GTTTGTTCCT GGAAAGGCTG GAG
GAGAACC ATTACAACAC CTATATATCC 540
AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTG GGC
CTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 600
GGTCCTCGGA CTCACTATGG CCAGAAAGCA ATC
TTGTTTC TCCCCCTGCC AGTCTCTTCT 660
GAT

6 6 3

【 0 0 5 9 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 1 7 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val
5 10 15
Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala
20 25 30
Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu

21 22

35 40 45

Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly

50 55 60

Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln

65 70 75 80

Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr

85 90 95

Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln

100 105 110

Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His

115 120 125

Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val

130 135 140

Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr

145 150 155 160

Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp

165 170 175

【 0 0 6 0 】 配列番号 : 4

配列の長さ : 5 2 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

20 配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60

CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGCGCCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC 120

GCTAATTACA AGAAGCCCAA ACTCCTCTAC TGTAGCAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC 180

CTTCCGGATG GCACAGTGGG TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240

CTCAGTGCCG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCACTACTTG 300

GCCATGGACA CCGACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTC 360

CTGAAAGGC TGGAGGAGAA CCATTACAAC ACCTATATAT CCAAGAAGCA TGCAGAGAAG 420

AATTGGTTTG TTGCCTCAA GAAGAATGGG AGCTGCAAAC GCGTCCTCG GACTCACTAT 480

GGCCAGAAAG CAATCTTGTT TCTCCCCTG CCACTCTCTT CTGAT 525

【 0 0 6 1 】 配列番号 : 5

配列の長さ : 1 8 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val

5 10 15

Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala

20 25 30

Arg Ala Gln Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly

50 55 60

Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln

65 70 75 80

Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr

85 90 95

Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln

100 105 110

Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Ala Ala

115 120 125

23 24

Thr Pro Ala Pro Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala
 130 135 140

Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg
 145 150 155 160

Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu
 165 170 175

Pro Val Ser Ser Asp
 180

【 0 0 6 2 】 配列番号 : 6
 配列の長さ : 5 4 3
 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖
 10 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAAGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
 CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GCGCCCCGCG CCCAAGGCAC GCTACTGGAC 120
 GCTAATTACA AGAAGCCCAA ACTCCTCTAC TGTAGCAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC 180
 CTTCCGGATG GCACAGTGGG TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240
 CTCAGTGCGG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCAGTACTTG 300
 GCCATGGACA CCGACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTC 360
 CTGGAAGGC TGGAGGAGGC TGCTACTCCA GCTCCAAACC ATTACAACAC CTATATATCC 420
 AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTG GGCCTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 480
 GGTCTCGGA CTCACTATGG CCAGAAAGCA ATCTTGTTC TCCCCTGCC AGTCTCTTCT 540
 GAT 543

【 0 0 6 3 】 配列番号 : 7
 配列の長さ : 3 0
 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTGTCGACCC ACCATGGCCC CCGCCCGTCT 30

【 0 0 6 4 】 配列番号 : 8
 配列の長さ : 2 6
 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 30 1列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTGATATCTA GAGGCACCAA GGGATG 26

【 0 0 6 5 】 配列番号 : 9
 配列の長さ : 3 5
 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACAG CGCTAATTAC AAGAAGCCCA AACTC 35

【 0 0 6 6 】 配列番号 : 1 0
 配列の長さ : 3 3
 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 40 配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CCGAATTCTGA ATTCTTTAAT CAGAAGAGAC TGG 3 3

【 0 0 6 7 】 配列番号 : 1 1
 配列の長さ : 6 4
 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACCC ACCATGTCCC GGGGAGCAGG ACGTGTTTCCAG GGCACGCTGC AGGCTCTCGT 60
 CTTC 64

【 0 0 6 8 】 配列番号 : 1 2

50 配列の長さ : 2 9

25

26

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGATATCCA GTAGCGTGCC GTTGGCGCG

29

【 0 0 6 9 】 配列番号： 1 3

鎖の数：一本鎖

配列の長さ： 1 8

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

G C G T C G A C C C A C C A T G T C

1 8

【 0 0 7 0 】 配列番号： 1 4

鎖の数：一本鎖

配列の長さ： 2 9

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGATATCCA GTAGCGTGCC TTGGGCGCG

29

【 0 0 7 1 】 配列番号： 1 5

鎖の数：一本鎖

配列の長さ： 3 8

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTGGAGGAG GCTGCTACTC CAGCTCCAAA CCATTACA

38

【 0 0 7 2 】 配列番号： 1 6

鎖の数：一本鎖

配列の長さ： 2 1

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCGCTCTAG AACTAGTGGA T

21

【 0 0 7 3 】 配列番号： 1 7

トポロジー：直鎖状

配列の長さ： 2 0 0

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly

1 5 10 15

Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu

20 25 30

Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val

35 40 45

Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly

50 55 60

Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly

65 70 75 80

His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp

85 90 95

Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly

100 105 110

Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp

115 120 125

Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu

130 135 140

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys

145 150 155 160

Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser

27

28

Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
 165 170 175
 Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
 180 185 190
 195 200

【 0 0 7 4 】 配列番号 : 1 8

配列の長さ : 6 0 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
 ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
 GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAGTGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
 TCTGGCTCTG GAGATGCTAA TTACAAGAAG CCCAACTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC 240
 CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG 300
 CACATTCAGC TGCAGCTCAG TCGGAAAAGC GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG 360
 ACTGGCCAGT ACTTGCCAT GGACACCGAC GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT 420
 GAGGAATGTT TGTTCCTGGA AAGGCTGGAG GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG 480
 AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGGCGT 540
 CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 600

【 0 0 7 5 】 配列番号 : 1 9

配列の長さ : 2 0 0

配列の型 : アミノ酸

20 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
 5 10 15
 Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
 20 25 30
 Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Ser Asp Asp Glu Asp Val
 35 40 45
 Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
 50 55 60
 Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly
 65 70 75 80
 His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp
 85 90 95
 Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly
 100 105 110
 Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp
 115 120 125
 Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu
 130 135 140
 Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys
 145 150 155 160
 Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser
 165 170 175
 Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe
 180 185 190
 Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
 195 200

【 0 0 7 6 】 配列番号 : 2 0

50 配列の長さ : 6 0 0

配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

ATGGCCCCCG CCCGCTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG   60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCGAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA  120
GCCCTATCAG ACGATGAGGA TGTAGTGGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG  180
TCTGGCTCTG GAGATGCTAA TTACAAGAAG CCCAACTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC  240
CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG  300
CACATTCAGC TGCAGCTCAG TCGGAAAGC GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG  360
ACTGGCCAGT ACTTGGCCAT GGACACCGAC GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT  420
GAGGAATGTT TGTTCTGGA AAGGCTGGAG GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG  480
AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT  540
CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT  600

```

【 0 0 7 7 】配列番号：2 1

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：2 5 4

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

```

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
                    5             10             15
Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
                    20             25             30
Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val
                    35             40             45
Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
                    50             55             60
Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His
                    65             70             75             80
Pro Leu Val Pro Leu Asp Asn His Ile Pro Glu Arg Ala Gly Ser Gly
                    85             90             95
Ser Gln Val Pro Thr Glu Pro Lys Lys Leu Glu Glu Asn Glu Val Ile
                    100            105            110
Pro Lys Arg Ile Ser Pro Val Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu
                    115            120            125
Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr
                    130            135            140
Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu
                    145            150            155            160
Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly
                    165            170            175
Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr
                    180            185            190
Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr
                    195            200            205
Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly
                    210            215            220
Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly
                    225            230            235            240
Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
                    245            250

```

【 0 0 7 8 】配列番号：2 2

50 配列の長さ：7 6 2

31

32

配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAGTGGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
TCTGGCTCTG GAGATCTGGA TGA CTGGAA GACTCCATGA TCGGCCCTGA AGTTGTCCAT 240
CCCTTGGTGC CTCTAGATAA CCATATCCCT GAGAGGGCAG GGTCTGGGAG CCAAGTCCCC 300
ACCGAACCCA AGAACTAGA GGAGAATGAG GTTATCCCCA AGAGAATCTC ACCCGTTGCT 360
AATTACAAGA AGCCCAAACCT CCTCTACTGT AGCAACGGGG GCCACTTCCT GAGGATCCTT 420
CCGGATGGCA CAGTGGATGG GACAAGGGAC AGGAGCGACC AGCACATTCA GCTGCAGCTC 480
AGTGCGGAAA GCGTGGGGGA GGTGTATATA AAGAGTACCG AGACTGGCCA GTACTTGGCC 540
ATGGACACCG ACGGGCTTTT ATACGGCTCA CAGACACCAA ATGAGGAATG TTTGTTCTCG 600
GAAAGGCTGG AGGAGAACCA TTACAACACC TATATATCCA AGAAGCATGC AGAGAAGAAT 660
TGTTTTGTTG GCCTCAAGAA GAATGGGAGC TGCAAACGCG GTCCTCGGAC TCACTATGGC 720
CAGAAAGCAA TCTTGTCTTCT CCCCCTGCCA GTCTCTTCTG AT 762

```

【 0 0 7 9 】 配列番号： 2 3

トポロジー：直鎖状

配列の長さ： 2 8 1

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

```

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
          5          10          15
Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
          20          25          30
Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val
          35          40          45
Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
          50          55          60
Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His
          65          70          75          80
Pro Leu Val Pro Leu Asp Asn His Ile Pro Glu Arg Ala Gly Ser Gly
          85          90          95
Ser Gln Val Pro Thr Glu Pro Lys Lys Leu Glu Glu Asn Glu Val Ile
          100          105          110
Pro Lys Arg Ile Ser Pro Val Glu Glu Ser Glu Asp Val Ser Asn Lys
          115          120          125
Val Ser Met Ser Ser Thr Val Gln Gly Ser Asn Ile Phe Glu Arg Thr
          130          135          140
Glu Val Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly
          145          150          155          160
Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg
          165          170          175
Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val
          180          185          190
Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met
          195          200          205
Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys
          210          215          220
Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser
          225          230          235          2 4 0

```


33
 L y s L y s H i s A l a G l u L y s A s n T r p P h e
 V a l G l y L e u L y s L y s A s n G l y
 2 4 5
 2 5 0
 S e r C y s L y s A r g G l y P r o A r g T h r H i s
 T y r G l y G l n L y s A l a I l e L e u
 2 6 0
 2 7 0
 P h e L e u P r o L e u P r o V a l S e r S e r A s p
 2 7 5 2 8 0

【 0 0 8 0 】 配列番号 : 2 4

配列の長さ : 8 4 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A t o m R N A

配列

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
 ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
 GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAGTGGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
 TCTGGCTCTG GAGATCTGGA TGA CTGGAA GACTCCATGA TCGGCCCTGA AGTTGTCCAT 240
 CCCTTGGTGC CTCTAGATAA CCATATCCCT GAGAGGGCAG GGTCTGGGAG CCAAGTCCCC 300
 ACCGAACCCA AGAACTAGA GGAGAATGAG GTTATCCCCA AGAGAATCTC ACCCGTTGAA 360
 GAGAGTGAGG ATGTGTCCAA CAAGGTGTCA ATGTCCAGCA CTGTGCAGGG CAGCAACATC 420
 TTTGAGAGAA CGGAGGTCGC TAATTACAAG AAGCCCAAAC TCCTCTACTG TAGCAACGGG 480
 GGCCACTTCC TGAGGATCCT TCCGGATGGC ACAGTGGATG GGACAAGGGA CAGGAGCGAC 540
 CAGCACATTC AGCTGCAGCT CAGTGCAGAA AGCGTGGGGG AGGTGTATAT AAAGAGTACC 600
 GAGACTGGCC AGTACTTGGC CATGGACACC GACGGGCTTT TATACGGCTC ACAGACACCA 660
 AATGAGGAAT GTTTGTTCTT GGAAAGGCTG GAGGAGAACC ATTACAACAC CTATATATCC 720
 AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTG GGCCTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 780
 GGTCTCCGGA CTCACTATGG CCAGAAAGCA ATCTTGTTTC TCCCCTGCC AGTCTCTTCT 840
 GAT 843

【 0 0 8 1 】 配列番号 : 2 5

配列の長さ : 1 7 2

配列の型 : アミノ酸

30 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val
 5 10 15
 Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala
 20 25 30
 Arg Ala Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys
 35 40 45
 Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp
 50 55 60
 Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn
 100 105 110
 Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr
 115 120 125
 Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys

35
130 135 140
Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys
145 150 155 160
Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
165 170

36

【 0 0 8 2 】 配列番号 : 2 6

配列の長さ : 5 1 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGCGCCCGCG CCAACGGCTC GGCTAATTAC 120
AAGAAGCCCA AACTCCTCTA CTGTAGCAAC GGGGGCCACT TCCTGAGGAT CTTTCCGGAT 180
GGCACAGTGG ATGGGACAAG GGACAGGAGC GACCAGCACA TTCAGCTGCA GCTCAGTGCG 240
GAAAGCGTGG GGGAGGTGTA TATAAAGAGT ACCGAGACTG GCCAGTACTT GGCCATGGAC 300
ACCGACGGGC TTTTATACGG CTCACAGACA CCAAATGAGG AATGTTTGTT CCTGGAAGG 360
CTGGAGGAGA ACCATTACAA CACCTATATA TCCAAGAAGC ATGCAGAGAA GAATTGGTTT 420
GTTGGCCTCA AGAAGAATGG GAGCTGCAAA CGCGGTCTCT GGACTIONA TGCCAGAAA 480
GCAATCTTGT TTCTCCCCT GCCAGTCTCT TCTGAT 516

【 0 0 8 3 】 配列番号 : 2 7

配列の長さ : 2 1 0

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

20 配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val
5 10 15
Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala
20 25 30
Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ser Arg Gly Trp Gly Thr Leu Leu
35 40 45
Ser Arg Ser Arg Ala Gly Leu Ala Gly Glu Ile Ser Gly Val Asn Trp
50 55 60
Glu Ser Gly Tyr Leu Val Gly Ile Lys Arg Gln Ala Asn Tyr Lys Lys
65 70 75 80
Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu
85 90 95
Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile
100 105 110
Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser
115 120 125
Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr
130 135 140
Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu
145 150 155 160
Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn
165 170 175
Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg
180 185 190
Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser
195 200 205
Ser Asp
210

37

38

【 0 0 8 4 】 配列番号 : 2 8

配列の長さ : 6 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

```

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAAGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC   60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGCGCCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC   120
TCCAGAGGCT GGGGCACCCT CTTGTCCAGG TCTCGAGCTG GGCTAGCTGG AGAGATTTCC   180
GGTGTGAATT GGGAAAGCGG CTATTTGGTG GGCATTAAGC GACAGGCTAA TTACAAGAAG   240
CCCAAACCTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA   300
GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG CACATTCAGC TGCAGCTCAG TCGGAAAGC   360
GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG ACTGGCCAGT ACTTGCCCAT GGACACCGAC   420
GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT GAGGAATGTT TGTTCTGGA AAGGCTGGAG   480
GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC   540
CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC   600
TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT                                     630

```

【 0 0 8 5 】 配列番号 : 2 9

配列の長さ : 1 8 0

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

```

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val
           5                10                15
Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala
           20                25                30
Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu
           35                40                45
Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly
           50                55                60
Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln
           65                70                75                80
Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr
           85                90                95
Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln
           100               105               110
Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Ala
           115               120               125
Thr Pro Ala Pro His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu
           130               135               140
Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly
           145               150               155               160
Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro
           165               170               175
Val Ser Ser Asp
           180

```

【 0 0 8 6 】 配列番号 : 3 0

配列の長さ : 5 4 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

```

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAAGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC   60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGCGCCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC   120
GCTAATTACA AGAAGCCCAA ACTCCTCTAC TGTAGCAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC   180

```

CTTCCGGATG GCACAGTGGG TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240
 CTCAGTGGCG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCAGTACTTG 300
 GCCATGGACA CCGACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTC 360
 CTGGAAGGC TGGAGGAGAA CGCTACTCCA GCTCCACATT ACAACACCTA TATATCCAAG 420
 AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT 480
 CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 540

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、代表的な硫酸化多糖およびグリコサミノグリカン糖鎖の例を示す。

【図 2】図 2 は、代表的なN-型糖鎖の例を示す。

【図 3】図 3 は、代表的なO-型糖鎖の例を示す。

【図 4】図 4 は、各種FGF-1a類似タンパク質のSDS変性電気泳動図を示す。

【図 5】図 5 は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aのHUVEC に対するDNA合成促進活性を示す。

【図 6】図 6 は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aの耐熱安定性、耐酸安定性および耐アルカリ安定性を示す。

10 【図 7】図 7 は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aのトリプシンに対する抵抗性を示す。

【図 8】図 8 は、N-FGF-6/1a-IVおよび大腸菌由来FGF-1aのHUVEC に対するDNA 合成促進活性を示す。

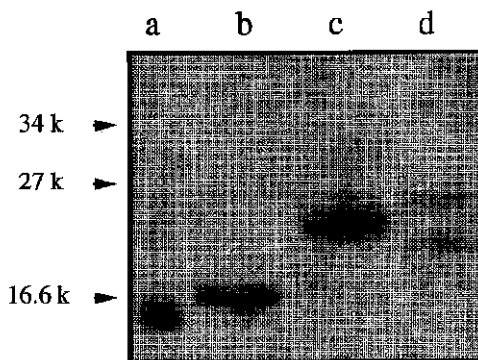
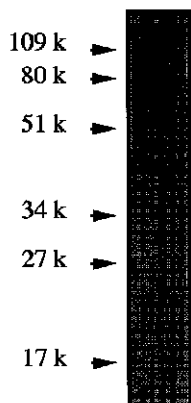
【図 9】図 9 は、S/FGF-1a-II のヘパリン親和性を示す。

【図 4】

図 4

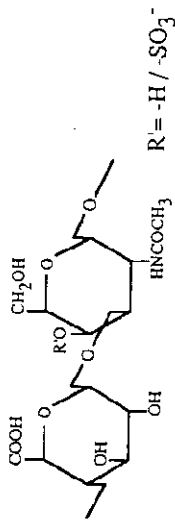
A) S/FGF-1a-II 蛋白質の SDS 変性電気泳動図

B) N-FGF-1a-IV、および O-FGF-1a 蛋白質の SDS 変性電気泳動図

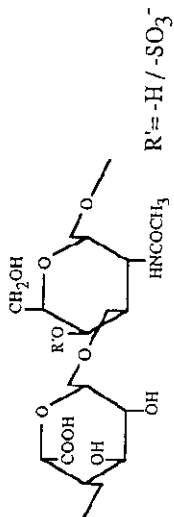


レーン a: 大腸菌で生産した FGF-1a
 レーン b: ペプチドN-グリコシダーゼFで処理することにより
 N-型糖鎖を除去した N-FGF-6/1a-II
 レーン c: N-FGF-6/1a-II
 レーン d: O-FGF-6/1a

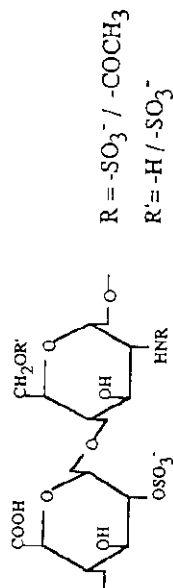
1) コンドロイチン硫酸 / (GlcA-GalN)n



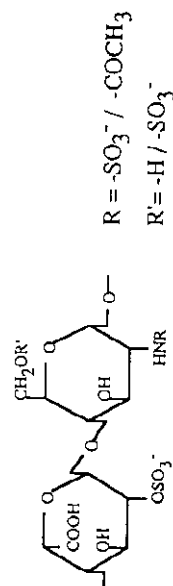
2) デルマトラン硫酸 / (IdoA/GlcA-GalN)n



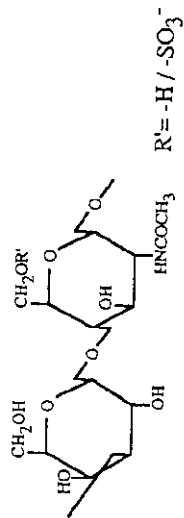
3) ヘパラン硫酸 / (GlcA/IdoA-GlcN)n



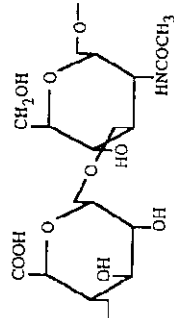
4) ヘパリン / (IdoA/GlcA-GlcN)n



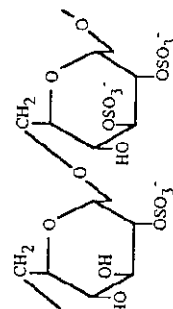
5) ケラタン硫酸 / (Gal-GlcN)n



6) ヒアルロン酸 / (GlcA-GlcN)n



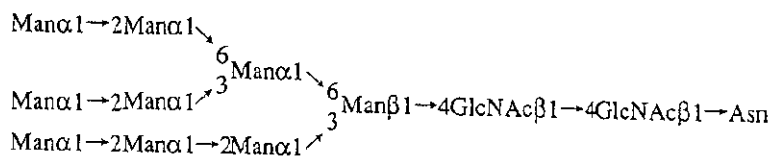
7) デキストラン硫酸 / (Glc-Glc)n



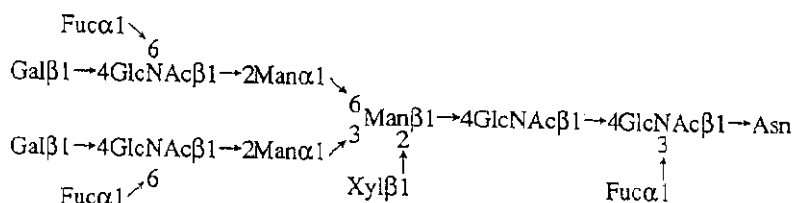
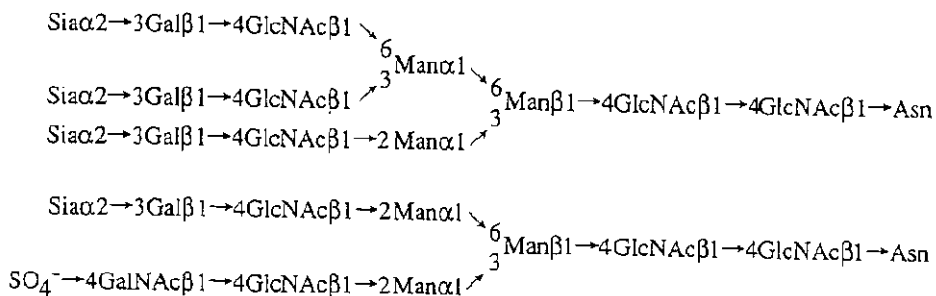
【 図 1 】

【 図 2 】

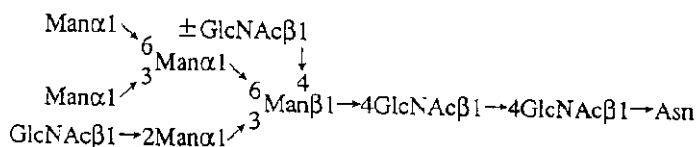
1) 高マンノース型



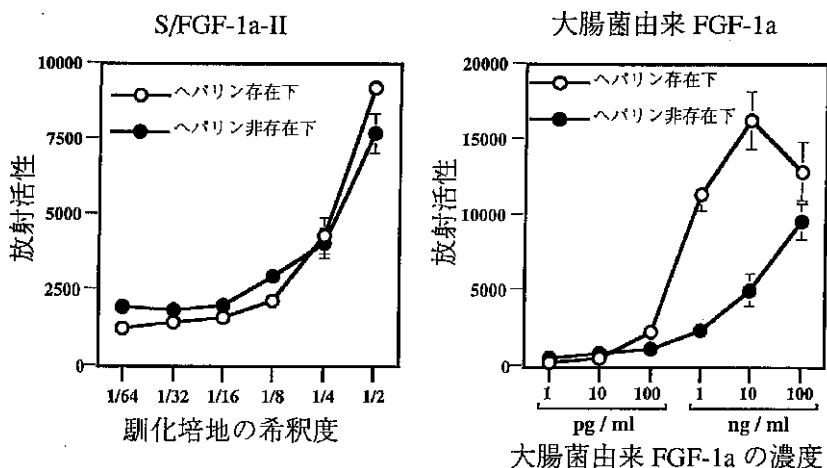
2) 複合型

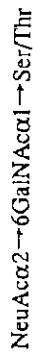
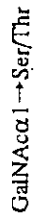


3) 混成型

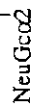
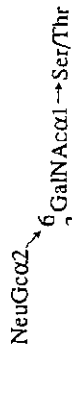
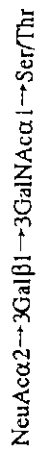
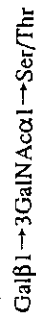


【 図 5 】





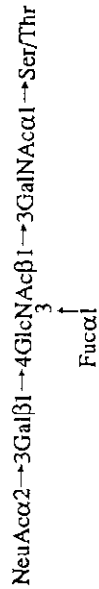
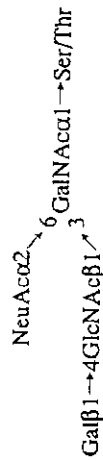
1) I 型 コア



2) II 型 コア



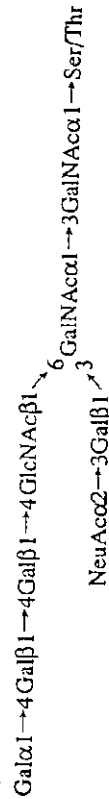
3) III 型 コア



4) IV 型 コア

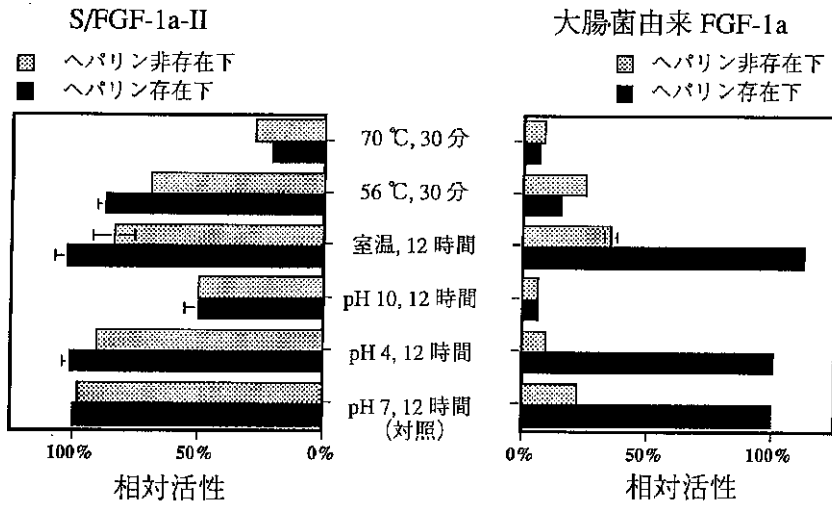


5) V 型 コア



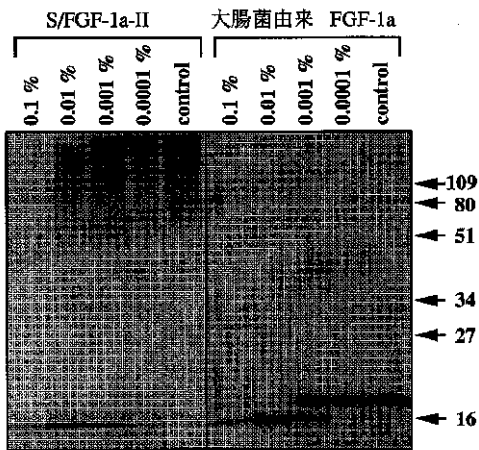
【 図 3 】

【 図 6 】

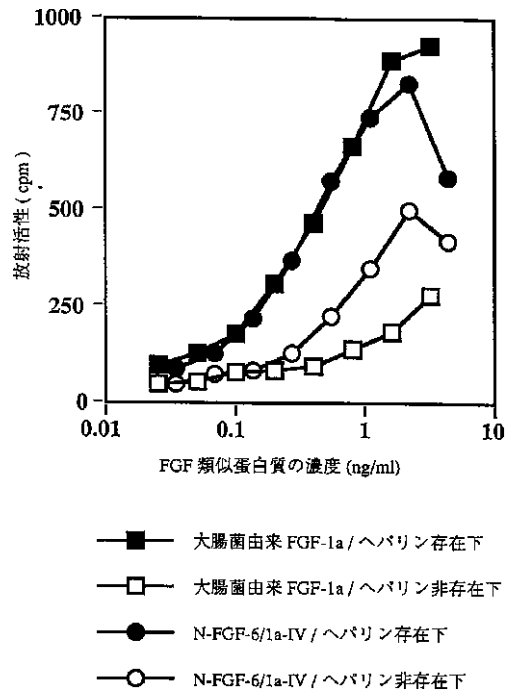


【 図 7 】

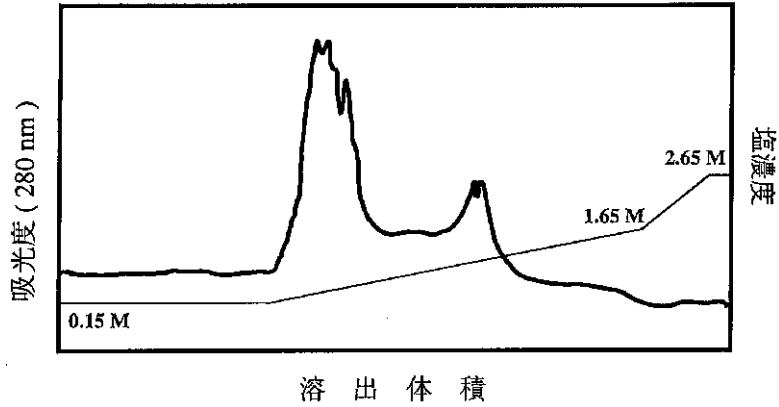
図 7



【 図 8 】



【図 9】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
A 6 1 P 25/16		A 6 1 P 25/28
		35/00
		43/00
	1 0 7	C 1 2 P 21/02
		H
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 21/02		15/00
// C 1 2 N 1/21		A 6 1 K 37/02
5/10		C 1 2 N 5/00
		B

(72)発明者 大田 恵子
 茨城県つくば市梅園 2 - 18 - 33 紫峰レ
 ジデンスM 2 - 3

(72)発明者 織田 裕子
 茨城県つくば市二の宮 1 - 12 - 17 - 203

(72)発明者 宮川 和子
 茨城県つくば市稲荷前17 - 12 沼尻アパ
 ート202

(72)発明者 折笠 訓子
 茨城県つくば市東新井22 - 10 大山ハイ
 ツ205

(72)発明者 浅田 知栄
 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技
 術院生命工学工業技術研究所内

(72)発明者 小嶋 哲人
 愛知県名古屋市昭和区折戸町 5 - 16

(56)参考文献 特開 平 2 - 227075 (J P , A)
 米国特許4478746 (U S , A)
 米国特許4280953 (U S , A)
 国際公開91 / 16335 (W O , A 1)
 国際公開88 / 1647 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)
 C07K 14/00 - 14/825
 C12N 15/11 - 15/61
 B I O S I S (D I A L O G)
 J I C S T ファイル (J O I S)
 M E D L I N E (S T N)
 P C I (D I A L O G)
 W P I (D I A L O G)

審査官 上條 肇